

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ (Ca, P) И ПРИМЕСНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ (Na, Mg, Al, Si, K, Fe) МЕТОДОМ ИСП-АЭС В ОБРАЗЦАХ БИОГЕННОГО АПАТИТА

Фокина А.К.^{1,2}, Киселева Д.В.¹, Чередниченко Н.В.¹

¹Институт геологии и геохимии УрО РАН, г. Екатеринбург

²УрФУ им. Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, asiy.fokina93_93@mail.ru

Введение

Твердые ткани (кости, зубы) человека и животных состоят из минеральной и органической фаз: эмаль содержит до 2 мас.% органического вещества, дентин до 30 мас.%, костные ткани – до 35% [Pan, Fleet, 2002 и др.]. Минеральная компонента твердых тканей состоит из минерала группы апатита - карбонат-гидроксиапатита биогенного происхождения. Уникальная способность накапливать из окружающей среды элементы-примеси обусловлена широкой изоморфной ёмкостью структуры апатита, выражающейся в замещении кальция на двух- и трехвалентные катионы примесей, а фосфатной и гидроксил-галогенной группировок - на другие анионные группировки, его нестехиометрическим кальций-дефицитным составом, а также микро- и наноразмерами его кристаллов [Pan, Fleet, 2002].

Изучение макро- и микроэлементного состава костных и зубных тканей человека и животных крайне важно в биомедицинских, экологических, археологических, палеоэкологических, палеонтологических и тафономических исследованиях [Elliott, 2002]. Основные и примесные элементы в фосфатных биоминералах содержат информацию, во-первых, о параметрах окружающей среды при жизни организма, таких как температура, состав употребляемой воды и пищи, места в трофической (пищевой) цепи, а во-вторых, об условиях, времени и масштабах диагенетического изменения палеосредового сигнала [Reynard, Balter, 2014].

Так, например, кальций (25-36 мас.%) и фосфор (11-18 мас.%) являются структурно-образующими элементами биогенного фосфата костной и зубной ткани, по их соотношению судят об отклонении от стехиометрического состава (отношение Ca/P равно 1.67 соответствует синтетическому гидроксиапатиту) [Gross, Berndt, 2002]; натрий, калий, магний (десятичные доли процента) являются важнейшими электролитами в жидких средах организма; железо, поступающее в ткани в еще более низких содержаниях (сотые доли процента), является важнейшим эссенциальным микроэлементом [Burguera, Burguera, 2009].

Благодаря высокой чувствительности, широкому диапазону градуировочного графика и возможности

проводить измерения большого количества элементов одновременно, методы атомной спектроскопии и масс-спектрометрии нашли широкое применение в анализе элементного состава биоапатитов, в частности масс-спектрометрия и атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС и ИСП-АЭС). ИСП-МС является непревзойденным методом определения микропримесного состава биоапатитов (когда содержания элементов не превышают 100 мкг/г [Burguera, Burguera, 2009]), а для определения более высоких концентраций требуется прибегать к многократному разбавлению пробы, что ведет к увеличению погрешности анализа. В этом случае метод ИСП-АЭС является предпочтительным, так как позволяет определять более высокие концентрации без разбавления. К тому же, ИСП-АЭС позволяет проводить анализ проблемных для квадрупольного масс-спектрометра вследствие изобарных наложений элементов (Ca, Fe, K) в достаточно широком диапазоне содержаний от сотых долей до десятков массовых процентов [Киселева и др., 2017].

Тем не менее, успешное применение перечисленных методов зависит от грамотно подобранного и эффективного способа растворения, обеспечивающего количественный перевод твердого образца биоапатита в раствор, а также удаление органической части. Решение данной задачи сводится к выбору оптимального способа растворения, который включает в себя подбор подходящего растворителя и условий разложения. Обычно для этого используются различные способы открытого и закрытого (в автоклавах) разложения с применением сильно окисляющих кислот или их смесей: азотной кислоты HNO_3 (иногда в комбинации с перекисью водорода H_2O_2), хлорной кислоты HClO_4 , при вспомогательном воздействии нагрева или микроволнового излучения [Burguera, Burguera, 2009]. Так, например, для растворения конодонтовых элементов (фторапатит), а также растворения зубных тканей человека использовано открытое разложение при нагревании HNO_3 с добавлением H_2O_2 , для послойного растворения зубной эмали - HClO_4 с последующим переводом в нитраты [Вотьяков и др., 2007; Ронь и др., 2012]. Смесь $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HNO}_3 + \text{HF}$ была использована для

микроволнового разложения костных остатков мелких млекопитающих четвертичного периода из отложений в карстовых полостях Урала [Смирнов и др., 2009].

Целью работы является разработка методики определения Na, Mg, Al, Si, K, Fe, а также Ca и P методом ИСП-АЭС в образцах биогенного апатита костной и зубной ткани ископаемого и современного человека. Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Подобрать схему растворения образцов, которая обеспечивала бы количественный перевод биогенного апатита в раствор и отделение от органической матрицы, минимизацию загрязнений из используемых реагентов, а также возможность последующего анализа основного и примесного состава методами ИСП-АЭС и ИСП-МС;

2. Подобрать операционные параметры ИСП-АЭС спектрометра при анализе Na, Mg, Al, Si, K, Fe, а также Ca и P;

3. На примере стандартного образца провести валидацию разработанной методики;

4. С применением разработанной методики провести разложение и ИСП-АЭС анализ рабочих образцов современной и ископаемой костной и зубной ткани.

Материалы и методы

Образцы. В данной работе для отработки процедуры растворения и ИСП-АЭС анализа использован стандартный образец золы кости (bone ash) NIST SRM 1400. В качестве рабочих проб использовались образцы костной ткани современного человека (клиника Уральского государственного медицинского университета), а также образцы ископаемой костной и зубной ткани человека и животных из укрепленных поселений и могильников Южного Урала бронзового века (Институт истории и археологии УрО РАН, Институт экологии растений и животных УрО РАН).

Пробоподготовка. Подготовку и измерение образцов проводили в помещениях с классом чистоты 6 и 7 ИСО Блока чистых помещений ИГГ УрО РАН. На всех стадиях анализа использована ультрачистая деионизованная вода (18.2 МОм·см). Лабораторная посуда и материалы, соприкасающиеся с реагентами и образцами, изготовлены из PTFE или полипропилена. Азотная кислота дополнительно очищена методом дистилляции при температуре ниже температуры кипения (Berghof, Германия). Перекись водорода H_2O_2 квалификации ОСЧ не давала значимого вклада в холостой опыт.

Для элементного анализа предварительно просушенные в течение 2 часов при 105°C образцы массой не менее 50 мкг и не более 100 мкг отбирали в полипропиленовые контейнеры объемом 50 см³. Для перевода образцов в раствор использовали смесь

14М HNO_3 и H_2O_2 . К пробе добавляли 0.5 мл 14М HNO_3 и 0.1 мл H_2O_2 и оставляли в вытяжном шкафу на 24 часа. Крышки закручивали не до конца для прохождения реакции газовой выделенной. Через 24 часа пробы нагревали на водяной бане в течение 30 минут. Наблюдалось выделение паров, что свидетельствовало о частичном удалении органики. Для того, чтобы полностью удалить органическую составляющую, пробы охлаждали в вытяжном шкафу, добавляли 15 мл 0.5% HNO_3 и кипятили на водяной бане в течение еще 30 минут. После этого охлаждали пробы до комнатной температуры, доводили ультрачистой водой до метки и отправляли на измерения. В случае последующих комбинированных измерений элементного состава методами ИСП-АЭС и ИСП-МС в пробирку вносился индий (элемент внутреннего стандарта для ИСП-МС) с содержанием 10 мкг/л. Для измерений кальция и фосфора готовый раствор разбавлялся в 200 раз.

Измерения элементного состава. Измерения проведены на ИСП-АЭС-спектрометре Optima 8000.

Оптимальные операционные условия для ИСП-АЭС-спектрометра Optima 8000 представлены в таблице 1.

Определяемые элементы с подобранными для них аналитическими линиями представлены в таблице 2.

Для построения градуировочных зависимостей использованы мультиэлементные стандартные растворы PerkinElmer с различными концентрациями: Al, Fe, K, Mg, Na и Si - 0.1;1;10 мг/л; P и Ca - 1;10;100 мг/л.

Результаты и обсуждение

Результаты графического сопоставления найденных и аттестованных содержаний в стандартном образце золы кости NIST SRM 1400 приведены на рис. 1.

Из рис. 1 видно, что найденные величины содержаний элементов удовлетворительно согласуются с аттестованными величинами. Таким образом, разработанная методика обеспечивает количественный перевод биогенного апатита в раствор и отделение от

Таблица 1. Оптимальные операционные условия при анализе на ИСП-АЭС-спектрометре Optima 8000

Параметр	Значение параметра
Мощность, Вт	1200
Пробоподающий поток аргона, л/мин	0,7
Вспомогательный поток аргона, л/мин	0,2
Плазмообразующий поток аргона, л/мин	8
Скорость подачи раствора, мл/мин	1,5
Регистрация спектра	по площади
Способ наблюдения	Радиальный/аксиальный
Распылитель	Поперечно-поточковый
Распылительная камера	Камера Скотта (Ryton)

Таблица 2. Аналитические линии при ИСП-АЭС определении элементов в биогенном апатите

Определяемый элемент	Аналитическая линия, нм		
	1	2	3
Al	394.401	396.153	
Fe	238.204	259.939	
K	766.490	769.896	
Mg	279.077	285.213	
Na	588.995	589.592	
Si	251.611	252.851	288.158
P	213.617	214.914	
Ca	315.887	317.933	

органической матрицы, минимизирует загрязнения, пригодна для последующего определения основного и примесного состава методами ИСП-АЭС и ИСП-МС.

С использованием разработанной методики исследованы образцы костной ткани современного человека, а также образцы ископаемой костной и зубной ткани человека и животных из укрепленных поселений и могильников Южного Урала бронзового века; результаты использованы для получения новых данных в области биомедицины и археологии.

Выводы

Разработана методика определения Na, Mg, Al, Si, K, Fe, а также Ca и P методом ИСП-АЭС в образцах биогенного апатита костной и зубной ткани ископаемого и современного человека и животных. С использованием стандартного образца золы кости NIST SRM 1400 подтверждена ее правильность. Методика использована для анализа костной ткани современного человека, а также ископаемой костной и зубной ткани человека и животных из укрепленных поселений и могильников Южного Урала бронзового века.

Работа выполнена в Центре коллективного пользования «Геоаналитик» в рамках госбюджетной темы № 0393-2016-0025 "Спектроскопия, спектрометрия и физика гео-, космо- и биогенных минералов на основе аналитических методик с высоким пространственным разрешением: оксиды, силикаты, фосфаты, карбонаты".

ЛИТЕРАТУРА

1. Вотяков С.Л., Киселева Д.В., Розанов А.Ю., Череди́ченко Н.В., Ушатинская Г.Т. Мультиэлементный масс-спектрометрический микроанализ в исследованиях биоминеральных образований. Литосфера, №1. 2007, С. 123-137.
2. Киселева Д.В., Череди́ченко Н.В., Дерюгина Л.К., Пинигина М.А. Возможности метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) при анализе горных пород и минералов. Труды Института геологии и геохимии им. академика А.Н. Заварицкого. 2017. № 164. С. 299-302.

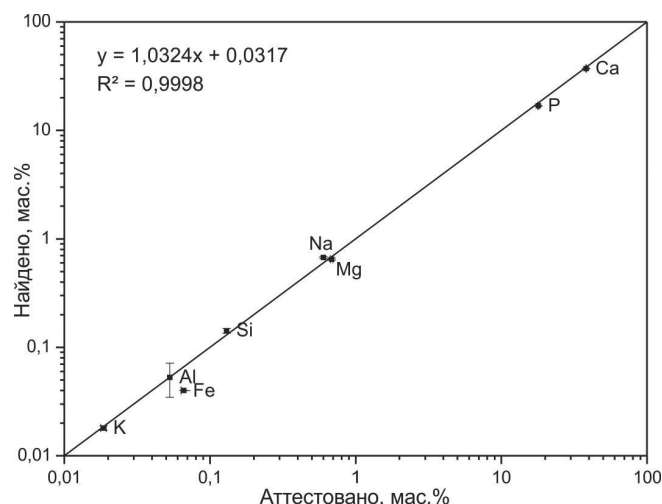


Рис. 1. Графическое сопоставление найденных и аттестованных содержаний в стандартном образце золы кости NIST SRM 1400

3. Ронь Г.И., Вотяков С.Л., Мандра Ю.В., Киселева Д.В. Морфологические структуры твердых тканей зубов человека. Екатеринбург: УГМА, 2012. 148 с.
4. Смирнов Н.Г., Вотяков С.Л., Садыкова Н.О., Киселева Д.В., Щапова Ю.В. Физико-химические характеристики ископаемых костных остатков млекопитающих и проблема оценки их относительного возраста. Часть 1. Термический и масс-спектрометрический элементный анализ. Екатеринбург: «Гошицкий», 2009. 118 с.
5. Burguera J.L., Burguera M. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. Spectrochimica Acta Part B. 2009. Vol. 64. P. 451–458.
6. Elliott J.C. Calcium phosphate biominerals. In Phosphates: Geochemical, geobiological, and materials importance (eds. Kohn M.J., Rakovan J. & Hughes J.M.). Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2002. Vol. 48. P. 427–453.
7. Gross K.A., Berndt C.C. Biomedical application of apatites. In Phosphates: Geochemical, geobiological, and materials importance (eds. Kohn M.J., Rakovan J. & Hughes J.M.). Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2002. Vol. 48. P. 633-672.
8. Pan Y., Fleet M. Compositions of the Apatite-group Minerals: Substitution mechanisms and controlling factors. In Phosphates: Geochemical, geobiological, and materials importance (eds. Kohn M.J., Rakovan J. & Hughes J.M.). Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2002. Vol. 48. P. 13-50.
9. Reynard B., Balter V. Trace elements and their isotopes in bones and teeth: Diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol. 2014. Vol. 416. P. 4-16.